Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

The effect of the Persian Gulf brown algae extract (*Sargassum Oligocystum*) on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro

Sajjad Masoumifard[1,2], Peyman Khezri[1,2], Habib Mohammadzadeh haji pirlo[2], Behnam Heshmatiayan[3], Shahram Khademvatan[2], Negar Manafpour[4]

1. Student Research Committee, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
2. Cellular and Molecular Research Center & Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
3. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran
4. Montgomery College, Maryland, USA, 20850

Downloaded from ijmm.ir at 21:01 +0330 on Sunday November 19th 2017

Article Information

Article history:
Received: 2017/01/22
Accepted: 2017/04/04
Available online: 2017/04/24

Article Subject:
Medical Parasitology

IJMM 2017; 11(1): 75-82

Corresponding author at:

Negar Manafpour
Dr. Shahram Khademvatan

Montgomery College, Maryland, USA, 20850
Cellular and Molecular Research Center and Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Tel: 0989123505391

Email:
Nmanafpo@motgomerycollege.edu
khademvatan@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Leishmaniasis is a disease which caused by *Leishmania* protozoan parasitic. Plant extracts and their derived compounds, provide a rich source of medicinal compounds which is by the World Health Organization considered as a candidate drug for the treatment of many diseases. This study aimed to evaluate anti-Leishmania effects of Persian Gulf brown algae extract compared to meglumine control drug in vitro.

Materials and Methods: *Leishmania major* promastigotes were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% FBS and antibiotics, at temperature 1 ± 24 and the effect of different concentrations of Persian Gulf brown algae was evaluated by MTT assay in comparison with meglumine on *Leishmania major* promastigotes. The optical density was read by ELISA reader at wavelength of 540-630 nm. The results are expressed as IC50 (Inhibitory Concentration %50).

Results: The IC50 amount of extract obtained as 20 µg/ mL for *Leishmania major* after 72 hours of incubation. So that the IC50 amount of meglumine control drug is 21.8 µg/mL for *Leishmania major*.

Conclusions: The effectiveness of these extracts on these parasites is roughly equivalent meglumine and have the potential of using as an anti-Leishmania drug but there is need to do more tests to assess effects of this extract on *Leishmania* agents in animal models and In vivo.

KeyWords: *Leishmania major*, Promastigote, Persian Gulf brown algae, MTT, in vitro

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Final Proof

How to cite this article:

Masoumifard S, Khezri P, Mohammadzadeh haji pirlo H, Heshmatiayan B, Khademvatan Sh, Manafpour N. The effect of the Persian Gulf brown algae extract (*Sargassum Oligocystum*) on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (1): 75-82

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۱ – فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Downloaded from ijmm.ir at 21:01 +0330 on Sunday November 19th 2017

اثر عصاره جلبک قهوه‌ای خلیج‌فارس (*Sargassum Oligocystum*) بر انگل *لیشمانیا ماژور* (MRHO/IR/75/ER) در محیط آزمایشگاهی

سجاد معصومی فرد[۱و۲]، پیمان خضری[۱و۲]، حبیب محمد زاده حاجی پیرلو[۲]، بهنام حشمتیان[۳]، شهرام خادم وطن[۲]، نگار مناف پور[۴]

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۲. مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۴. کالج مونگمری، مریلند، ایالات‌متحده آمریکا، ۲۰۸۵۰

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۳

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۱۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۲/۰۴

موضوع:

انگل شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(1): 75-82

نویسنده مسئول:

نگار مناف پور

دکتر شهرام خادم وطن

کالج مونگمری، مریلند، ایالات‌متحده آمریکا، ۲۰۸۵۰

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی و گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۳۵۰۵۳۹۱

پست الکترونیک:

Nmanafpo@motgomerycollege.edu
khademvatan@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: لیشمانیازیس بیماری ناشی از انگل‌های تک‌یاخته‌ای *لیشمانیا* می‌باشد. عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مشتق شده از آن‌ها منبع غنی از ترکیبات دارویی را فراهم می‌کنند که این داروها توسط سازمان بهداشت جهانی به‌عنوان داروهای کاندید درمان بسیاری از بیماری‌ها در نظر گرفته‌شده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره جلبک قهوه‌ای خلیج‌فارس در مقایسه با داروی کنترل گلوکانتیم در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار: پروماستیگوت های انگل *لیشمانیا ماژور* در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و آنتی‌بیوتیک، در دمای ۱±۲٤ کشت داده شد و تأثیر غلظت‌های مختلف جلبک قهوه‌ای خلیج‌فارس در مقایسه با گلوکانتیم بر روی پروماستیگوت های انگل *لیشمانیا ماژور* با روش رنگ سنجی MTT موردبررسی قرار گرفت. میزان جذب نوری به‌وسیله دستگاه الیزا ریدر در طول‌موج ٥٤٠–٦٣٠ نانومتر قرائت شد و سپس نتایج به‌صورت IC50 (Inhibitory concentration%50) بیان‌شده است.

یافته‌ها: میزان IC50 عصاره بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، برای *لیشمانیا ماژور* ۲۰ µg/mL به دست آمد به‌طوری‌که میزان IC50 داروی کنترل گلوکانتیم برابر ۲۱/۸ µg/mL برای *لیشمانیا ماژور* هست.

نتیجه‌گیری: اثربخشی این عصاره بر روی این‌گونه انگل تقریباً معادل گلوکانتیم می‌باشد و بنابراین دارای پتانسیل استفاده از آن به‌عنوان داروی ضد لیشمانیایی می‌باشد اما ضرورت انجام آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل *لیشمانیا* در مدل‌های حیوانی و In vivo احساس می‌شود.

کلمات کلیدی: *لیشمانیا ماژور*، پروماستیگوت، عصاره جلبک دریایی خلیج‌فارس، in vitro، MTT

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

لیشمانیازیس یک عفونت انگلی بوده و عامل به وجود آورنده آن تک‌یاخته‌ای به نام *لیشمانیا* می‌باشد (۱،۲).

لیشمانیا (*Leishmania*) متعلق به خانواده *تریپانوزومیده* (*Trypanosomidae*) می‌باشد و توسط نیش پشه‌های خاکی (*Sandfly*) از جنس *فلبوتوموس* (*Phlebotomus spp*) به انسان منتقل می‌شود (۳).

این بیماری به اشکال مختلف نظیر ضایعات جلدی (سالک)، احشایی (کالاآزار) و جلدی _ مخاطی بروز می‌کند. نوع جلدی به دو شکل اصلی: خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) مشاهده می‌شود (۴).

در حال حاضر ۱۲ میلیون نفر در ۹۸ کشور به *لیشمانیا* مبتلا هستند و هرساله نزدیک به ۲ میلیون مورد جدید به این

Downloaded from ijmm.ir at 21:01 +0330 on Sunday November 19th 2017

بیماری آلوده می‌شوند و بین ۲۰ تا ۵۰ هزار نفر در پی آن جان خود را از دست می‌دهند (۵).

در ایران لیشمانیوزیس جلدی یکی از بیماری‌های بومی در اکثر نقاط کشور است و گونه‌های *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* عامل لیشمانیوزیس جلدی می‌باشند. متأسفانه علی‌رغم شیوع قابل‌توجه لیشمانیوز، روش پیشگیری, کنترل و درمان قطعی برای آن وجود ندارد. (۶).

به همین دلیل سازمان جهانی بهداشت برای مبارزه و کنترل این بیماری اهمیت ویژه‌ای قائل می‌باشد و آن را جزء مهم‌ترین برنامه‌های خود قرار داده است (۷).

داروهای خط اول در درمان این بیماری‌ها ترکیبات ۵ ظرفیتی آنتی موان ازجمله: مگلومین آنتیمونات (گلوکانتیم) و سدیم استیبوگلوکونات (پنتوستام) می‌باشند (۸،۹).

این ترکیبات با اثر بر روی آنزیم‌های انگلی بخصوص وقفه در آنزیم فسفوکیناز باعث جلوگیری از تولید آدنوزین تری فسفات می‌شوند (۱۰).

اغلب داروهایی که برای درمان لیشمانیوز استفاده می‌شوند، دارای یک یا چند محدودیت، ازجمله اینکه مقرون‌به‌صرفه نیستند، ازنظر نحوه مصرف و همچنین سمیت دارای مشکلاتی می‌باشند و مهم‌ترین مسئله در مورد این داروها گسترش مقاومت انگل به این داروها می‌باشد. ازاین‌رو نیاز به گسترش ترکیبات ضد لیشمانیایی مؤثر، کم‌هزینه، با سمیت کم و همچنین باقابلیت تجویز از راه خوراکی، نسبت به گذشته، بیشتر احساس می‌شود (۱۱،۱۲).

با توجه به اینکه داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هرگونه عارضه هستند و از طرفی در دسترس و ارزان می‌باشند، این موضوع ضرورت استفاده از گیاهان بومی هر منطقه را بدین منظور مورد تأکید قرار می‌دهد (۱۳).

سازمان بهداشت جهانی در نظر دارد تحقیقات بیشتری درزمینه استفاده سنتی از گیاهان برای پیدا کردن فراورده‌های دارویی جدیدتر، بهتر و کاراتر و با سمیت کمتر بکار ببرد (۱۴).

در همین راستا با توجه به تنوع آب و هوایی و درنتیجه فلور گیاهی بسیار متنوع در ایران امکان شناسایی مواد مؤثر گیاهی در گیاهان مختلف بومی کشور و استخراج آن‌ها به‌منظور تولید این مواد به مقدار زیاد و در سطح صنعتی وجود دارد، این کار به‌ویژه در مورد گیاهانی که منحصر به ایران هستند و تاکنون کمتر موردبررسی قرارگرفته‌اند، اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۵).

جلبک‌های دریایی حاوی مقادیر بالایی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، کاروتنوئید، فیبر و اسیدهای چرب ضروری هستند و کاربرد غذایی دارند. جلبک‌ها علاوه بر غذا می‌توانند کاربرد صنعتی، آرایشی و پزشکی نیز داشته باشند (۱۶).

جلبک‌ها به‌واسطه داشتن پلی ساکاریدهای ارزشمندی مانند: آگار، کاراژینان و آلژینات، دارای ارزش و اهمیت اقتصادی زیادی نیز هستند (۱۷).

جلبک‌ها منبعی غنی از ترکیبات مفید و فعال زیستی می‌باشند. تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی همچون اثرات آنتی‌بیوتیکی, ضدویروسی, ضد قارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و مشتق شده‌اند که بسیاری از متابولیت های اولیه و یا ثانویه این جانداران می‌توانند به مواد فعال موردعلاقه صنایع دارویی تبدیل شوند (۱۸).

جلبک قهوه‌ای دریای خلیج‌فارس از خانواده *Sargassaceae* و از جنس *Sargassum* بوده، معمولاً نام اصلی آن را *Sargassum Oligocystum Montagane* گویند (۱۹).

گونه‌های متفاوت از جنس جلبک سارگاسوم حاوی پلی ساکاریدهایی با فعالیت بیولوژیکی هستند که پایه آن‌ها قند فوکوز است و تاکنون خواص مهم ضد باکتریایی نظیر تأثیر روی باسیلوس سوبتیلیس، ضدویروسی علیه هرپس سیمپلکس و ضد سرطانی از نوع روده‌ای نشان داده‌اند (۲۰).

در ایران مطالعات کمی روی خواص زیست فعال این منابع ارزشمند انجام‌گرفته است و مطالعات متعدد زیست‌فناوری در این زمینه ضروری می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر عصاره جلبک‌های قهوه‌ای خلیج‌فارس *Sargassum Oligocystum* بر انگل *لیشمانیا ماژور* (MRHO/IR/75/ER) در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره *Sargassum Oligocystum*

جلبک قهوه‌ای خلیج‌فارس از مرکز تحقیقات گیاهان دریایی بوشهر تهیه و قسمت‌های غیرقابل استفاده آن‌ها جدا شد و چند بار با آب‌شور دریا (آب مقطر+ نمک مخصوص دریا (coral pro salt) با کد ۰۵۱۲۱۰۰۱۱۴) به‌منظور پاک شدن

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 21:01 +0330 on Sunday November 19th 2017

ناخالصی‌های احتمالی همراه، شست‌وشو داده شد. سپس در دمای اتاق کاملاً خشک و به‌صورت پودر درآمد و در یک پرکولاتور شیشه‌ای با متانول مجاور و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و تاریکی انکوبه شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت روی شیکرو با مگنت مغناطیسی تکان داده شد تا مواد مؤثره آن خارج و مایع رویی با استفاده از صافی‌های ۰/۴۵ میکرونی فیلتر و محصول تا حد خروج تمام الکل با روش تقطیر در خلأ تا حد خشک شدن، تغلیظ و به‌صورت پودر تا زمان انجام آزمایش‌ها در یخچال نگهداری گردید. در زمان استفاده این پودر در PBS با DMSO1% حل‌شده (۲۱) و جهت جلوگیری از آلودگی، فیلتر شد. سپس رقت‌های ۰,۵، ۰,۱، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وزنی- حجمی به کمک محیط کشت RPMI تهیه شد.

تهیه داروی کنترل گلوکانتیم

از داروی مگلومین آنتی مونات بانام تجارتی گلوکانتیم (Glucantime ®) به‌عنوان کنترل استفاده‌شده است. این دارو یک آنتی موان ۵ ظرفیتی است. این دارو در دمای ۴°C نگه‌داری شده و در زمان انکوباسیون به‌وسیله RPMI-1640 رقیق شد.

تهیه و کشت انگل

در این تحقیق تجربی از پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژورسویه* MRHO/IR/75/ER که از دانشکده بهداشت دانشگاه تهران تهیه‌شده استفاده شد. ابتدا پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FBS) و ۱۰۰IU/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین در دمای ۲۴±۲ °C، کشت داده شد. با استفاده از لام نئوبار تعداد پروماستیگوت‌هایی که در محیط کشت RPMI به فاز ثابت رشد (stationary–phase) رسیدند در زیر میکروسکوپ شمارش و به تعداد ۵ mL/cell×10^5 سلول تنظیم گردید.

روش رنگ سنجی MTT

MTT یک روش کمی اسپکتروفوتومتری غیر رادیواکتیو برای تعیین تکثیر سلولی، حیات سلولی و تعیین سمیت داروها است. این روش، یک روش رنگ سنجی است کی طی آن نمک تترازولیوم (MTT) به یک محصول ارغوانی فورمازان نامحلول تبدیل می‌گردد. این واکنش احیا توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی انگل صورت می‌پذیرد که به‌عنوان یک مؤلفه رشد و زنده‌بودن پروماستیگوت ها در برابر پاسخ دارویی بکار می‌رود، به‌طوری‌که کاهش در مقدار MTT احیاشده نشان‌دهنده سمیت دارو برای انگل می‌باشد. برای تهیه محلول استوک MTT، ۵ mg از پودر زردرنگ MTT خریداری‌شده از شرکت (sigma) در یک میلی‌لیتر PBS حل و در ۲۰- ° C نگهداری شد. محلول کار به‌طور تازه با مخلوط کردن یک حجم از محلول استوک MTT با ۹ حجم محیط کشت RPMI دارای ۵/۲٪ FBS تهیه و استفاده شد به‌طوری‌که غلظت نهایی MTT به ۵/۰ mg/mL می‌رسید (۲۲،۲۴).

اضافه کردن پروماستیگوت ها، دارو و عصاره *Sargassum Oligocystum*

از پروماستیگوت‌های *لیشمانیای* موجود در محیط کشت که در فاز ثابت رشد بودند به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای به‌صورت Doplicate اضافه شد به‌نحوی‌که در هر چاهک تعداد ۵۰۰ هزار پروماستیگوت قرار گرفت. سپس از عصاره جلبکی و داروی گلوکانتیم در رقت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و به میزان ۱۰ میکرولیتر برداشته و به هر چاهک اضافه شد، علاوه بر این از شاهد (بلانک) که حاوی فقط ۱۰۰ µL محیط کشت فاقد پروماستیگوت یا دارو است، استفاده شد. همچنین به چاهکی دیگر فقط پروماستیگوت های انگل *لیشمانیا ماژور* به‌عنوان کنترل اضافه شد و میکروپلیت ها را در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط انکوباسیون قرار داده شد. بعد اتمام زمان انکوباسیون، میکروپلیت ها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰RPM سانتریفوژ کرده و محلول رویی را جدا و به باقیمانده ۲۰ µL از محلول MTT کار به هر چاهک اضافه شد .چاهک کنترل منفی حاوی ۱۰۰ µL محیط کشت و فقط ۲۰ µL از محلول MTT می‌باشد. بعد از گذشت ۳-۴ ساعت انکوباسیون و سانتریفوژ کردن آن محلول رویی را جدا و کریستال‌های فورمازان را با اضافه کردن ۱۰۰ µL از محلول DMSO به هر یک از چاهک‌ها حل کرده و خوب مخلوط می‌کنیم و بعد از ۱۵ دقیقه جذب نوری (OD,Optical Dendity) را با دستگاه الیزا ریدر در طول‌موج ۵۴۰-۶۳۰ نانومتر قرائت شد. سپس میزان IC50 (Inhibitory concentration%50) یعنی غلظتی که ۵۰ درصد از پروماستیگوت ها را مهار می‌کند، محاسبه گردید (۲۲،۲۵).

مشاهده تغییرات مورفولوژیک در پروماستیگوت‌های مواجه شده با عصاره

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 21:01 +0330 on Sunday November 19th 2017

سلول‌ها در دور پایین g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ و در محلول PBS به‌صورت سوسپانسیون درآمده شد. سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ بررسی و حداقل ۲۰ زمینه میکروسکوپی برای هر نمونه موردمطالعه قرار گرفت. تغییرات مرفولوژیک نظیر شکل و حرکت در زمان‌های ۰-۲۴-۴۸-۷۲ ساعت پس از مواجه با پروماستیگوت ها در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

با استفاده از نرم‌افزار EXEL درصد viability سلول‌های کنترل و سلول‌های مواجه شده و با دارو با استفاده از این فرمول به دست آمد:

$$\text{Viable Cells\%} = [(AT - AB) / (AC - AB)] \times 100$$

به‌طوری‌که AC جذب نوری سلول‌های کنترل، AT جذب نوری سلول‌های درمان شده با عصاره جلبک قهوه‌ای و گلوکانتیم، AB جذب نوری بلانک می‌باشد. درنهایت نتایج به‌صورت IC50 به‌وسیله رگرسیون خطی با استفاده از نرم‌افزار EXEL محاسبه گردید. جذب نوری به‌دست‌آمده به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده و فعال مرتبط است (۲۲،۲۳).

یافته‌ها

جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره جلبک قهوه‌ای و گلوکانتیم و میزان زنده‌بودن (Viability) پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* (MRHO/IR/75/ER) به‌منظور یافتن IC50 توسط تست MTT بررسی شد. تست MTTیک آزمون رنگ سنجی که جهت بررسی پرولیفراسیون سلول‌ها به کار گرفته و نحوه عمل آن سنجش تبدیل رنگ تترازولیوم MTT به کریستال‌های فورمازان توسط سلول‌های زنده می‌باشد. اثرات ضد *لیشمانیایی* (IC50) عصاره جلبک قهوه‌ای و داروی کنترل گلوکانتیم پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انکوباسیون بر روی رشد پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا ماژور* و *لیشمانیا اینفانتوم* در جدول ۱ نشان داده‌شده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان IC50 عصاره جلبک قهوه‌ای در زمان‌های مختلف، به ترتیب ۸۷/۶ µg/mL، ۳۵/۵ µg/mL، ۲۰µg/mL برای پروماستیگوت_های *لیشمانیا ماژور* می‌باشد که این نشان از فعال بودن این عصاره علیه این انگل‌ها در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف می‌باشد. به همین ترتیب IC50 های گلوکانتیم برای *لیشمانیا ماژور* به ترتیب زمانی ۹۶/۷۶ µg/mL، ۴۴/۵ µg/mL، ۲۱/۸ µg/mL می‌باشد. غلظت دوز کشنده داروی گیاهی جلبک قهوه‌ای خلیج‌فارس که در آن تقریباً ۱۰۰٪ سلول های *لیشمانیا ماژور* از بین می‌روند، ۵ mg/mL به دست آمد.

جدول ۱: IC50 های عصاره جلبک قهوه‌ای و داروی گلوکانتیم پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت انکوباسیون علیه پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور*

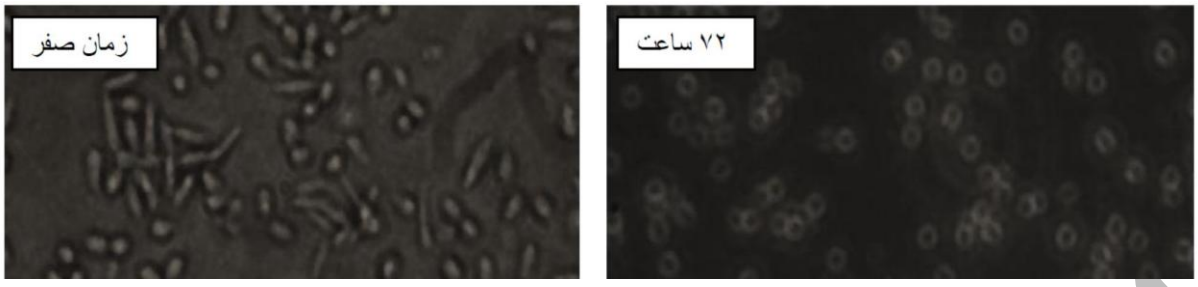
نام ترکیب	IC50 (µg/ml)		
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
عصاره جلبک قهوه‌ای	۸۷/۶	۳۵/۵	۲۰
گلوکانتیم	۹۶/۷۶	۴۴/۵	۲۱/۸

تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌ها

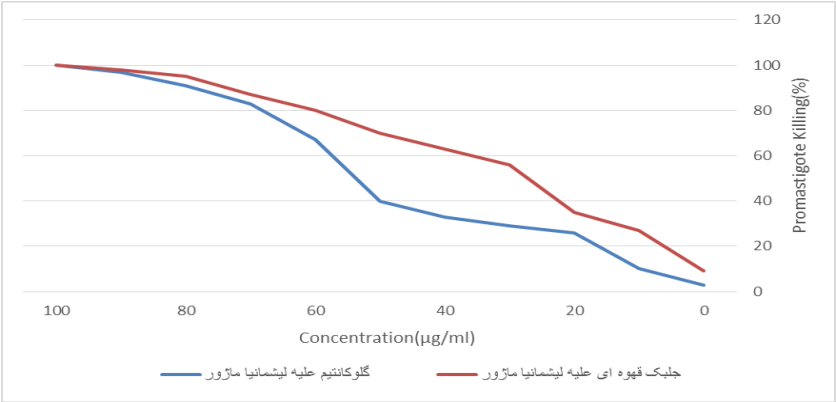
تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* مواجهه شده با غلظت ۵ mg/mL (IC50) عصاره جلبک قهوه‌ای بررسی شد که بعد از ۱۰ ساعت مواجهه شدن با عصاره تغییرات بروز کرده و بعد از ۷۲ ساعت تمام سلول‌ها شروع به چروکیدن (cell shrinkage)، گرد شدن، متراکم شدن سیتوپلاسم (Cytoplasmic condensation) و کوچک‌تر شدن کردند. هیچ‌گونه تغییری در پروماستیگوت‌های کنترل مشاهده نشد.

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 21:01 +0330 on Sunday November 19th 2017



شکل ۱: تغییرات مورفولوژیک پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* در زمان صفر و ۷۲ ساعت پس از تیمار شدن با عصاره‌ی جلبک قهوه‌ای خلیج‌فارس



نمودار ۱: درصد مرگ پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* در غلظت‌های مختلف عصاره جلبک قهوه‌ای خلیج‌فارس و داروی گلوکانتیم بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون

بحث

لیشمانیازیس یک عفونت انگلی بوده، این بیماری به اشکال مختلف نظیر ضایعات جلدی (سالک), احشایی (کالاآزار) و جلدی _ مخاطی بروز می‌کند. نوع جلدی به دو شکل اصلی: خشک (شهری) و مرطوب (روستایی) مشاهده می‌شود (۱،۴).

در ایران لیشمانیوزیس جلدی یکی از بیماری‌های بومی در اکثر نقاط کشور است و گونه‌های *لیشمانیا تروپیکا* و *لیشمانیا ماژور* عامل لیشمانیوزیس جلدی می‌باشند (۶).

سمیت و مقاومت دارویی از مشکلات عمده مرتبط با دارودرمانی بیماری لیشمانیوز می‌باشد .به دلیل کاهش تأثیر داروهای خط اول در درمان لیشمانیوز (مثل ترکیبات پنج ظرفیتی آنتیموان) و هزینه بالا و در دسترس نبودن داروهای خط دوم درمان (مثل آمفوتریسین B و میلتفوسین) بسیاری از محققین بر آن شدند تا جایگزین مناسبی برای این دسته از داروها بیابند (۲۶).

با توجه به اینکه داروهای گیاهی در بسیاری از موارد فاقد هرگونه عارضه هستند و از طرفی در دسترس و ارزان می‌باشند، این موضوع ضرورت استفاده از گیاهان بومی هر منطقه را بدین منظور مورد تأکید قرار می‌دهد (۱۳).

جلبک‌های دریایی حاوی مقادیر بالایی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، کاروتنوئید، فیبر و اسیدهای چرب ضروری هستند و کاربرد غذایی دارند و به‌واسطه داشتن پلی ساکاریدهای ارزشمندی مانند: آگار، کاراژینان و آلژینات، دارای ارزش و اهمیت اقتصادی زیادی نیز هستند (۱۶،۱۷).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* به این عصاره حساس هستند و با بالا بردن غلظت عصاره جلبک قهوه‌ای و زمان تیمار شدن انگل‌ها با عصاره میزان اثربخشی نیز بیشتر شده و یک رابطه مستقیم بین میزان غلظت عصاره و اثربخشی آن وجود دارد. همچنین مقایسه IC50 بین عصاره و داروی کنترل نشان می‌دهد که اثربخشی این عصاره بر روی *لیشمانیا ماژور* نسبت به گلوکانتیم کمی بیشتر است.

گونه‌های متفاوت از جنس جلبک سارگاسوم حاوی پلی ساکاریدهایی با فعالیت بیولوژیکی هستند که پایه آن‌ها قند فوکوز است و پیش‌ازاین خواص مهم ضد باکتریایی نظیر تأثیر

Final Proof

روی *باسیلوس سوبتیلیس*، ضدویروسی علیه *هرپس سیمپلکس* و ضد سرطانی از نوع روده‌ای نشان داده‌اند (۲۰). همچنین در سال ۲۰۱۲، Stella Mary و همکاران با بررسی اثر عصاره اتانولی جلبک Sargassum sp بر روی MCF-7 (سرطان پستان) و Hep-2 (سرطان کبد) در غلظت‌های مختلف (۱۰۰ µg/ml-۳۰۰µg/mL) نشان دادند که درصد زنده ماندن سلول‌ها با افزایش غلظت کاهش می‌یابد (۲۷).

همچنین در سال ۲۰۱۰ zandi و همکاران اثرات ضد سرطانی جلبک‌های قهوه‌ای sargassum oligocystum آب‌های خلیج‌فارس را بررسی نمودند. در این تست‌ها بهترین اثر سایتوتوکسیکی عصاره جلبک بر روی سلول سرطانی انسانی Daudi به مقدار ۵۰۰ µg/mL می‌باشد و بروی سلول‌های سرطانی K562 به مقدار ۴۰۰ µg/mL می‌باشد. بنابراین امروزه می‌توان از داروهای گیاهی و عصاره آن‌ها بخصوص عصاره جلبک قهوه‌ای با اثرات جانبی کمتر را جایگزین داروهای شیمیایی ضد سرطانی با اثرات جانبی زیاد کنیم (۲۸).

با توجه به این‌که عصاره جلبک قهوه‌ای اثر مطلوبی بر سلول‌های سرطانی دارد و همچنین انگل‌های *لیشمانیا* دارای میتوکندری بزرگ و فعال هستند، لذا اثرات این ترکیب بر انگل‌های *لیشمانیا* مورد انتظار بود و نتایج مطالعه حاضر نیز اثربخشی بر روی پروماستیگوت های *لیشمانیا ماژور* به‌صورت برون تنی را نشان داد، لذا انجام آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل *لیشمانیا* در مدل‌های حیوانی و انسان‌های داوطلب، احساس می‌شود که این خود بزرگ‌ترین محدودیت این مطالعه می‌باشد چراکه فرم اصلی بیماری‌زای این انگل، فرم داخل سلولی (آماستیگوت) آن می‌باشد و برای اینکه این عصاره را به‌عنوان یک ترکیب ضد لیشمانیایی بدانیم نیاز به مطالعات گسترده داریم.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از دپارتمان انگل‌شناسی و حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به دلیل همکاری‌های ایشان تشکر می شود. این مقاله بخشی از نتایج حاصل از گرنت پژوهشی کمیته تحقیقات دانشجویی وزارت بهداشت و دانشگاه علوم پزشکی ارومیه با شماره 31394-01-42-214 می باشد.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Davies CR, Mazloumi Gavgani AS. Ageacquired immunity and the risk of visceralleishmaniasis: a prospective study in Iran.Parasitology 1999; 119(3): 247-257.
2. Saki J, Meamar AR, Oormazdi H, Akhlaghi L,Maraghi S, Mohebali M, et al. Mini-Exon genotyping of leishmania species in Khouzestan province, southwest of Iran. Iran J Parasitol 2010; 5(1): 25-34.
3. Desjeux P. Leishmaniasis. current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004;27:305–318
4. Katakura K. Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). Curr Opin Infect Dis 2009; 22(2):126-30.
5. Costa LE,Goulart LR, Pereira NC, Lima MI, Duarte MC, et al. Mimotope–Based Vaccines of Leishmania infantum Antigens and their Protective Efficacy against Visceral Leishmaniasis. Pols One. 2014; 9(10):1-13.
6. Nadeem A, Javadian E, seiedi-Rashti A. Epidemiology Leishmaniasis in Iran:in Leishmania and Leishmaniasis. Tehran:Tehran university publication center;1994.p176-200.
7. Ahmadi K, Mahmoudzadeh PA, Esfahani AA. Effect of garlic extract on cutaneous leishmaniasis and the role of nitric oxide. Iran J Med Sci 2002; 27: 97-100.
8. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res 2006;123(3):399-410.
9. Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Med Infect Dis 2007;5(3):150-8
10. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. Curr Pharm Des 2002;8(4):319-42.
11. Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. Fitoterapia 2009; 80(2): 81.
12. Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on Leishmania parasitised RAW 264.7 cells. Phytochemistry 2005;66(17):2056-71.

Downloaded from ijmm.ir at 21:01 +0330 on Sunday November 19th 2017

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 21:01 +0330 on Sunday November 19th 2017

13. Lamidi M, DiGiorgio C, Delmas F, Favel A, Eyele Mve-Mba C, Rondi ML, et al. In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. J Ethnopharmacol 2005;102(2):185-90.

14. Rates S M. plant as source of drugs.Toxicon 2007; 39(5):603-13.

15. Abbasi N, Azizi F, Abdi M, Saifmanesh M. A Comparative Study of the Antimicrobial Effect of Scrophularia striata Boiss. Extract and Selective Antibiotics Against Staphylococcus aureus and Pesudomonas aeroginosa. J Med Plants 2007; 1(Sup3):10-18.

16. Kotnala S, Garg A, Chatterji A. Screening for the presence of antimicrobial activity in Few Indian seaweeds. Pertanika J Trop Agric Sci 2009; 32(1):69-75.

17. Taskin E, Ozturk M, Kurt O. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). African J Biotechnol 2007;6(24):2746-51.

18. Barsanti L, Gualtieri P. Algae anatomy, biochemistry and biotechnology. New York: Taylor and Francis Group; 2006.

19. Yeh ST, Lee CS. and Chen J C. Administrasion of hot water extract of brown seaweed Sargassum duplicatum via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp Litopenaeus vannamei. Fish Shellfish Immunol 2006; 20: 332-345.

20. Zhuang C, Itoh H, Mizuno T. Ito H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed Umitoranoo (Sargassum thunbergii). Biosci Biotechnol Bi 1995;59: 563– 567.

21. Feily A, Saki J, Maraghi S, Moosavi Z, Khademvatan S, Siahpoosh A. In vitro activity of green tea extract against Leishmania major promastigotes. Int J Clin Pharmacol Ther 2012; 50(3):233–6.

22. Khademvatan S, Adibpour N, Eskandari A, Rezaee S, Hashemitabar M, Rahim F. In silico and in vitro comparative activity of novel experimental derivatives against Leishmania major and Leishmania infantum promastigotes. Exp Parasitol 2013; 135(2):208–16.

23. Khademvatan S, Gharavi MJ, Akhlaghi L, Samadikuchaksaraei A, Mousavizadeh K, Hadighi R, Saki J .Induction of apoptosis by miltefosine in Iranian strain of Leishmania infantum promastigotes . Iran J Parasitol 2009; 4 (2): 23-31.

24. Poorrajab F, Ardestani SK, Foroumadi A, Emami S, Kariminia A, Behrouzi- Fardmoghadam M. et al. Selective leishmanicidal effect of 1,3,4-thiadiazole derivatives and possible mechanism of action against Leishmania species. Exp Parasitol 2009; 121, 323-30.

25. Khademvatan S, Saki J, Gharavi MJ, Rahim F. Allium sativum extract induces apoptosis in leishmania major (MRHO/IR/75/ER) promastigotes, J Med plants Res 2011; 16:3725-32.

26. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006; 19, 111-26.

27. Stella Mary J, Vinotha P, Andrew M. Pradeep. Screening for in vitro Cytotoxic Activity of Seaweed, Sargassum sp. Against Hep-2 and MCF-7 Cancer Cell Line. Asian Pacific J Cancer Prev2012; 13(12):6073-6076.

28. Zandi K, Ahmadzadeh S, Tajbakhsh S, rTastian Z, Yousefi F, Farshadpour F, Sartavi K. Anticancer activity of Sargassum oligocystum water extract against human cancer cell lines. Eur Rev Med. Pharmacol Sci 2010; 14: 669-673.

Final Proof